

С.Ю. Штрыголь, С.М. Дроговоз, М.В. Зупанец, А.В. Кононенко

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДСТВ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Национальный фармацевтический университет (г. Харьков, Украина)

Патологии опорно-двигательного аппарата работоспособного населения являются одной из важнейших социальных и медицинских проблем. К сожалению, для лечения данных заболеваний нет ни одного противоартритного лекарственного средства без побочных реакций. В связи с этим, актуальным является поиск современных противоартритных лекарственных средств, особенно природного происхождения, как менее токсичных. В данной работе изучены антиартритные свойства 2-х фармакологически активных веществ природного происхождения: комбинация соли глюкозамина и фенилантраниловой кислоты (БИСГ-1) и густого экстракта из листьев рябины обыкновенной (ГЭЛРО) на модели коллаген-индуцированного артрита. Доказано, что БИСГ-1 и ГЭЛРО на фоне развития аутоиммунного артрита оказывают выраженное положительное влияние на показатели воспалительного процесса.

Ключевые слова: артрит, глюкозамин, фенилантраниловая кислота, густой экстракт листьев рябины обыкновенной.

ВВЕДЕНИЕ

Нестероидные противовоспалительные средства (НПВС) являются наиболее распространенной группой лекарственных средств, обладающих противовоспалительным действием [1,2]. Однако системное действие НПВС сопровождается большим количеством побочных эффектов, которые существенно снижают возможность их применения, вызывая необходимость поиска более безопасных противовоспалительных средств. Для последних сырье природного происхождения является перспективной альтернативой при создании эффективных и безопасных противовоспалительных средств.

По данным литературы известно, что с давних времен в народной медицине рябина обыкновенная применяется при ле-

чении различных заболеваний суставов в связи с высоким содержанием в листьях биологически активных веществ, оказывающих противовоспалительное (фенольные соединения, антоцианы), антиоксидантное (антоцианы, аскорбиновая кислота), репаративное действие (каротиноиды) [3].

Глюкозамин (ГА) – это аминасахарид, который является естественным компонентом суставного хряща, активирует синтез протеогликанов синовиальной жидкости, угнетает ферменты, фосфолипазу A2, коллагеназу, образование супероксидных радикалов, снижает активность ферментов лизосом [4–8].

N-фенилантраниловая кислота – это производное антраниловой кислоты, которая обладает противовоспалительным, анальгетическим, антиоксидантным, мембраностабилизирующим, жаропонижающим, гепатопротекторным действием [9–11].

Целью данной работы является сравнение антиартритной активности 2-х новых фармакологически активных веществ природного происхождения: D-(+)-глюкозиламониевая соль замещенная 5-нитро-N-фенилантраниловой кислоты (БИСГ-1); густой экстракт листьев рябины обыкновенной (ГЭЛРО).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование влияния БИСГ-1 и ГЭЛРО на течение коллаген-индуцированного артрита (КИА) проведено на 50 белых крысах обоего пола массой 180–200 г, которые были распределены на 5 групп по 10 животных в каждой: первая группа – интактный контроль; вторая группа – контрольная патология; третья и четвертая группы животных с КИА, получавшие БИСГ-1 в дозе 11 мг/кг, что соответствует эквимолекулярной дозе по отношению к диклофенаку натрия 8 мг/кг, и ГЭЛРО в дозе 100 мг/кг, доза которого была определена как условно-терапевтическая в скрининговых исследованиях на моделях карагенинового и зимозанового отеков у крыс [12]. Референтным лекарственным средством был выбран «золотой стандарт» противоартритной терапии натрия диклофенак в дозе 8,0 мг/кг (Вольтарен, "Novartis Pharma S.A.S.", табл. по 25 мг) [1, 12].

В ходе эксперимента у крыс 2, 3, 4 и 5 групп воспроизводили аутоиммунный артрит путем подкожного введения в основание хвоста эмульгированной смеси 0,2 % раствора бычьего коллагена II типа ("Sigma-Aldrich", США) в 0,1 М уксусной кислоте и полного адьюванта Фрейнда ("Sigma-Aldrich", США) в соотношении 1:1 в дозе 2 мг/кг по коллагену. Через неделю для потенцирования аутоиммунного процесса повторно вводили иммунизирующую смесь в той же дозе. Начиная с 14 дня и в течение последующих дней эксперимента крысам 3 и 4 групп внутривенно вводили фармакологически активные вещества (БИСГ-1 и ГЭЛРО) в виде водных суспензий 1 раз в сутки, а животным 5 группы в таком же терапевтическом режиме вводили референтное средство.

Измеряли объем задней правой лапы крысы при помощи цифрового плетизмометра ИТС Life Science (США) на 14 и 28 день артрита, рассчитывая величину отека.

На 14 и 28 день с помощью стандартных методов определяли маркеры воспа-

ления: количество лейкоцитов и скорость оседания эритроцитов (СОЭ); содержание сialовых кислот (СК) по методу Гесса и С-реактивного белка определяли с помощью иммунохимических наборов "ИммуЛА-Тест" производства "PLIVA-Lachema Diagnostika" (Чехия) [3]. На 28-е сутки эксперимента животных подвергали декапитации под эфирным наркозом с целью клинических и биохимических исследований показателей крови.

Организация доклинической экспериментальной работы на лабораторных животных осуществлялась с соблюдением принципов «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и научных целей» (Страсбург, 1986), V-го Национального конгресса по биоэтике (Киев, 2013), что подтверждено заключением локальной биоэтической комиссии НФаУ (№3 от 19.03.2014) [12, 13].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программы Statistica 6.0 на основе однофакторного дисперсионного анализа с использованием критерия Краскела-Уолиса, Ньюмена-Кейлс при уровне достоверности $p < 0,001$ [11, 14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После моделирования коллаген-индуцированного артрита (КИА) у животных наблюдалось развитие полиартрита, проявлением которого была гиперемия, отек конечностей с увеличением их объема и болезненностью при нажатии. На 10-14 день эксперимента наблюдалось максимальное проявление признаков полиартрита. У животных снижалась подвижность в течение дня, потребление пищи и воды.

На фоне модельного КИА в группах животных на 14 день (пик патологии) отмечался отек конечностей, который по разнице объема лап по отношению к исходному находился на уровне от $0,8 \pm 0,07$ до $0,88 \pm 0,04$ см³. На 28 день эксперимента в группе крыс наибольшая противовоспалительная активность (54 %) отмечалась на фоне применения диклофенака натрия. Антиэкссудативная активность наблюдалась и при применении на фоне КИА фармакологически активных веществ БИСГ-1 и ГЭЛРО и составила 42,1 и 35,5 %, соответственно (таблица 1).

Таблица 1 – Сравнение антиэкссудативной активности БИСГ-1 и ГЭЛРО на модели коллаген-индуцированного артрита по разнице (Δ) объема лапы крысы, в см^3 ($n = 10$)

Исследуемая группа	14 день, $\Delta \text{ см}^3$	28 день, $\Delta \text{ см}^3$	Активность на 28 день
Контрольная патология (КП)	0,88±0,04	0,83±0,03	-
БИСГ-1; 11,0 мг/кг	0,86±0,06	0,54±0,02 ***	42,1 %
ГЭЛРО; 100 мг/кг	0,80±0,07	0,61±0,02 ***	35,5 %
Натрия диклофенак; 8,0 мг/кг	0,85±0,02	0,44±0,02 ***	54,0 %

Примечание: * – $p < 0,001$ по отношению к КП на 28 день; ** – $p < 0,001$ по отношению к показателю на 14 день эксперимента.

На 14 сутки на фоне патологии уровень лейкоцитов и СОЭ во всех экспериментальных группах были на одном уровне. В группе КП количество лейкоцитов составляло $18,79 \pm 0,54 \times 10^9/\text{л}$. На 28 сутки эксперимента у животных с контрольной патологией количественное содержание лейкоцитов составило $18,61 \times 10^9/\text{л}$, а СОЭ – 8,94 мм/час, что соответственно в 1,8 и в 2 раза превысило показатель интактных животных. Следовательно, прослеживалась прямая корреляционная зависимость между степенью увеличения объема лапы крысы и увеличением количества лейкоцитов в крови и скоростью оседания эритроцитов (СОЭ) (таблица 2).

Наиболее значимое нормализующее действие при КИА на показатели лейкоцитов и СОЭ имело средство под шифром БИСГ-1. На 28 сутки лечения животные данной группы не имели достоверных различий относительно интактных животных и достоверно отличались на 50 % от показателей животных группы контрольной патологии (таблица 2).

На фоне применения ГЭЛРО и референтного средства отмечалась также положительная динамика снижения уровня лей-

коцитов и СОЭ относительно нелеченных животных с КИА. Динамика показателей данной группы была тождественна показателям животных, получавших БИСГ-1. Так, при применении ГЭЛРО количество лейкоцитов было статистически достоверно снижено на 39 % по отношению к контрольной патологии, а СОЭ приближалась к показателю интактных животных (таблица 2).

Следовательно, вышеизложенная закономерность иллюстрирует значительный антиартритный потенциал БИСГ-1 и ГЭЛРО, что подтверждено нормализующим влиянием на маркерные показатели воспалительной реакции (лейкоциты и СОЭ) при КИА.

При сравнении антиартритного действия 3-х исследуемых средств следует отметить, что положительное влияние на уровень лейкоцитов было более выражено у БИСГ-1 и натрия диклофенака, чем у ГЭЛРО. Все три изучаемых средства восстановили СОЭ до нормы (таблица 2).

Маркерными показателями воспалительной составляющей патологического процесса при артритах является С-реактивный белок и сиаловые кислоты (СК) [15]. На 14 и 28 день артрита у груп-

Таблица 2 – Влияние БИСГ-1 и ГЭЛРО на показатели уровня лейкоцитов и СОЭ на модели коллаген-индуцированного артрита ($n = 10$)

Опытная группа	Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	СОЭ, мм/час
Исходные данные		
Интактный контроль	10,04±0,33	4,22±0,31
14 сутки		
Контрольная патология	18,79±0,54*	8,98±0,65*
БИСГ-1, 11 мг/кг	18,72±0,44**	9,02±0,31**
ГЭЛРО; 100 мг/кг	18,73±0,93**	8,89±0,96**
Натрия диклофенак; 8,0 мг/кг	18,78±0,57**	8,96±0,42**
28 сутки		
Контрольная патология	16,73±0,37*	7,80±0,34*
БИСГ-1, 11 мг/кг	9,31±0,41**	4,58±0,24**
ГЭЛРО; 100 мг/кг	11,41±1,61**	4,49±0,94**
Натрия диклофенак; 8,0 мг/кг	10,24±0,45**	4,93±0,42**

Примечания: * – $p \leq 0,05$ относительно интактных животных; ** – $p \leq 0,05$ относительно контрольных животных.

пы контрольной патологии по отношению к интактным животным в 5,5 раза повышался уровень С-реактивного белка и в 1,3 раза уровень СК, что свидетельствует об активном развитии иммуновоспалительного патологического процесса в соединительной ткани животных, который приводит не только к появлению воспалительной реакции, но и к деструкции ткани [6].

На модели КИА доказана положительная динамика нормализации данных биохимических показателей на фоне лечения исследуемыми средствами (таблица 3). На 28 день эксперимента на фоне применения БИСГ-1 отмечалась нормализация содержания С-реактивного белка, приближавшегося до уровня интактных животных. Статистически достоверно понижался в 2,8 раза данный показатель и относительно нелеченных животных. Под влиянием

вещества БИСГ-1 снижалось содержание СК в 1,3 раза по отношению к контрольной патологии. Следует отметить, что БИСГ-1 по степени нормализующего влияния на уровень С-реактивного белка и СК достоверно не превышает лекарственное средство сравнения натрия диклофенак, который снижал данные показателя до 8,6 мг/л и 3,52 ммоль/л, соответственно (таблица 3).

При применении ГЭЛРО содержание С-реактивного белка в сыворотке крови животных на 28 день эксперимента понижалось до 12,59 мг/л (на 38 % по отношению к контрольной патологии). Однако этот показатель достоверно отличается от интактного контроля в 5,5 раза. Под влиянием ГЭЛРО отмечалась тенденция к снижению уровня СК (до $3,95 \pm 0,23$ ммоль/л) по отношению к контрольной патологии ($4,46 \pm 0,36$ ммоль/л).

Таблица 3 – Влияние БИСГ-1 и ГЭЛРО на содержание С-реактивного белка и сиаловых кислот в сыворотке крови на модели коллаген-индуцированного артрита (n = 10)

Исследуемые группы	С-реактивный белок, мг/л	Сиаловые кислоты, ммоль/л
Исходные данные		
Интактный контроль	$3,65 \pm 0,34$	$3,35 \pm 0,32$
14 сутки		
Контрольная патология	$21,09 \pm 0,34^*$	$4,42 \pm 0,36$
БИСГ-1; 11 мг/кг	$19,89 \pm 0,34^{**}$	$4,43 \pm 0,44^{**}$
ГЭЛРО; 100 мг/кг	$20,07 \pm 0,46^{**}$	$4,40 \pm 0,36^*$
Натрия диклофенак; 8,0 мг/кг	$20,13 \pm 0,69^{**}$	$4,41 \pm 0,43^{**}$
28 сутки		
Контрольная патология	$20,19 \pm 0,65^*$	$4,46 \pm 0,36$
БИСГ-1; 11 мг/кг	$7,11 \pm 0,47^{**}$	$3,41 \pm 0,34^{**}$
ГЭЛРО; 100 мг/кг	$13,02 \pm 0,62^{**}$	$3,95 \pm 0,23^*$
Натрия диклофенак; 8,0 мг/кг	$8,59 \pm 0,65^{**}$	$3,52 \pm 0,26^{**}$

Примечания: * – $p \leq 0,05$ относительно интактных животных; ** – $p \leq 0,05$ относительно группы контрольной патологии.

ВЫВОДЫ

1. Доказано, что БИСГ-1 и ГЭЛРО оказывают выраженное противовоспалительное действие на развитие аутоиммунного артрита.

2. Исследуемые вещества по степени влияния на маркерные показатели воспаления (лейкоциты, СОЭ, СК, С-реактивный белок) приближаются к натрию диклофенаку, за исключением ГЭЛРО, который уступает лекарственному средству сравнения во влиянии на уровень лейкоцитов и С-реактивного белка.

3. Антиэкссудативное (противоотечное) действие натрия диклофенака в сред-

нем на 15 % выше аналогичного действия БИСГ-1 и ГЭЛРО.

4. БИСГ-1 и ГЭЛРО являются перспективными природными корректорами воспалительно-деструктивных заболеваний суставов с аутоиммунным компонентом.

SUMMARY

S.Y. Shtrygol, S.M. Drogozov,
M.V. Zupanets, A.V. Kononenko
STUDY OF THE ANTIINFLAMMATORY
ACTIVITY OF PHARMACOLOGICALS
DRUGS OF NATURAL ORIGIN

Pathology of the musculoskeletal system of working population is one of the major social and

health problems. Unfortunately, for the treatment of these diseases, there is no single antiarthritic drug without side reactions. In this regard, the current search for advanced antiarthritic drugs, especially of natural origin, as less toxic, is actual. In this paper we study the properties of 2 antiarthritic pharmacological preparations of natural origin: a combination of salt of glucosamine and phenylanthranilic acid and thick extract from the leaves of mountain-ash using the model of collagen-induced arthritis. It was proved that a combination of salt of glucosamine and phenylanthranilic acid and thick extract from the leaves of mountain-ash against the background of autoimmune arthritis have a marked positive effect on the inflammatory process.

Keywords: arthritis, glucosamine, phenylanthranilic acid, thick extract of leaves of mountain-ash.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дроговоз, С.М. Перспективы создания противовоспалительных средств на основе D-(+)-глюкозиламониевых солей 3-оксамоилзамещенных N-фенилантраниловых кислот и экстракта листьев рябины обыкновенной / С.М. Дроговоз, М.В. Зупанец, А.В. Кононенко // Научно-производственный журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств». – 2013. – №2 (3). – С. 64–67.
2. EULAR evidence-based recommendations for the diagnosis of knee osteoarthritis / W. Zhang [et al.] // Ann. Rheum. Dis. – 2009. – Vol. 68, № 13. – P. 141.
3. Кононенко, А.В. / Вивчення протизапальної активності густого екстракту горобини звичайної на моделі ад'ювантного артрити у щурів / А.В. Кононенко, С.М. Дроговоз, К.Г. Щокіна // Вісник фармації. – 2013. – №1. – С. 70–73.
4. Зупанець, І.А. Експериментальне вивчення протизапальної активності композиції глюкозаміну гідрохлориду та диклофенаку натрію на моделі карагенінового набряку / І.А. Зупанець, С.Б. Попов, І.А. Отрішко // Клінічна фармація. – 2002. – Т.6, № 2. – С. 48–50.
5. Клинико-фармацевтические основы фармакодинамики глюкозамина / В.П. Черных [и др.] // Вісник фармакології та фармації. – 2008. – № 4. – С.40–46.
6. Тулякова, В.О. Розробка протипрозоїчних препаратів з хондропротекторною, протизапальною та анальгетичною дією на основі аміноцукру глюкозаміну: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра фарм. наук – Х., 2008. – 36 с.
7. Keller, L. Glucosamine for arthritis / L. Keller // Adv. Nurse Pract. – 2003. – Vol. 11, № 6. – P. 19–21.
8. Huser, C.A. Effect of glucosamine derivative on impact-induced chondrocyte apoptosis *in vitro* / C.A. Huser, M. Peacock, M.E. Davies // Osteoarthritis Cartilage. – 2008. – № 16. – P. 125–128.
9. Ісаєв, С.Г. Синтез і дослідження біологічної активності 3,5-динітро-N-фенілантранилових кислот / С.Г. Ісаєв, О.Л. Чикіна, Г.П. Жегунова // Мед. хімія. – 2004. – Т. 6. – №4. – С. 13–17.
10. Пошук протизапальних речовин серед D-(+)-глюкозиламонієвих солей заміщених 5-нітро-N-фенілантранилових кислот / М.В. Зупанець [та інш.] // Клінічна фармація. – 2013. – Т. 17, №2. – С. 52–55.
11. Синтез та фармакологічна активність D-(+)-глюкозиламонієвих солей 3-оксамоїлзаміщених N-фенілантранилових кислот / М.В. Зупанець [та інш.] // Клінічна фармація. – 2013. – Т. 17, №3. – С. 38–41.
12. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації / За ред.: член-кор. АМН України О.В. Стефанова. – К.: Авіценна, 2001. – 528 с.
13. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes – Strasbourg, 18.III.1986.
14. Зупанець, І.А. Фармакологічне дослідження анальгетичної активності препаратів терафлекс і терафлекс аванс / І.А. Зупанець, С.К. Шебеко // Здоров'я України. – 2008. – С. 70–71.
15. Liacini, A. Triptolide suppresses proinflammatory cytokine-induced matrix metalloproteinase and aggrecanase-1 gene expression in chondrocytes / A. Liacini, J. Sylvester, M. Zafarullah // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2005. – Vol. 327. – P. 320–327.

Адрес для корреспонденции:

61002, Украина,
г. Харьков, ул. Мельникова, 12;
эл. почта: maksym_zupanets@mail.ru;
тел.: +38 (067) 833-03-19,
Зупанець М.В.

Поступила 05.05.2014 г.